

ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

ACCESSION NUMBER: 1990-087311 [12] WPIDS  
DOC. NO. CPI: C1990-038455  
TITLE: Complex of fibroblast growth factor (FGF) mutein - and  
its stable compsns. with glycosamino glycan in aq.  
medium.  
DERWENT CLASS: B04 D16  
PATENT ASSIGNEE(S): (TAKE) TAKEDA CHEM IND LTD  
COUNTRY COUNT: 1  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG
JP 02040399	A	19900209	(199012)*		

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
JP 02040399	A	JP 1988-187367	19880727

PRIORITY APPLN. INFO: JP 1988-187367 19880727

AN 1990-087311 [12] WPIDS

AB JP 02040399 A UPAB: 19930928

A complex of FGF mutein and glycosaminoglycan or a compsn. contg. them is novel. Also claimed is a method for the prepn. of the compsn. FGF mutein by contact with glycosaminoglycan in an aq. medium.

USE/ADVANTAGE - FGF mutein is stable in the novel compsn.

In an example, M 13 vector of human bFGF gene is cloned. It is used as the template for site-directed mutagenesis. Mutagenised plaque is screened and identified. Gene coding human bFGF mutein is expressed in E. coli to give rhbFGF mutein CS23 (I). (I) is added to 20 mM phosphate buffer to 200 microg/ml. Heparin Na (II) (M.W.: 5000 to 25000) is added to it to 200 microg/ml and incubated at 37 deg C for 48 hrs.. The residual FGF activity is 100% after 48 hrs., compared to 3% for the control with no addn. of (II). The FGF activity is determined by using bovine fetal hear endothelial cell.

Heparan sulphate Na and dermatan sulphate Na also show 100% activity after 48 hrs. in a Dulbecco MEM medium contg. 10% bovine fetal serum.  
0/0

ANSWER 1 OF 1 JAPIO COPYRIGHT 1999 JPO and Japio

ACCESSION NUMBER: 90-040399 JAPIO  
TITLE: COMPLEX OR COMPOSITION OF FIBROBLAST CELL GROWTH  
FACTOR MUTEIN  
INVENTOR: KATO KOICHI; KAWAHARA KENJI; KAJIO TOMOKO  
PATENT ASSIGNEE(S): TAKEDA CHEM IND LTD, JP (CO 000293)  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	ERA	MAIN IPC
JP 02040399A		19900209	Heisei (5)	C07K013-00

APPLICATION INFORMATION

STN FORMAT: JP 88-187367 19880727

ORIGINAL: JP63187367 Heisei

SOURCE: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Unexamined Applications,  
Section: C, Sect. No. 712, Vol. 14, No. 197, P. 155  
(19900423)

INT. PATENT CLASSIF.:

MAIN: (5) C07K013-00

SECONDARY: (5) A61K037-02; (5) A61K037-02; (5) A61K037-02; (5)  
A61K037-02; (5) A61K037-02; (5) C12N015-12; (5)  
C12P021-02

CLASSIFICATION: 14.1 ORGANIC CHEMISTRY - Organic compounds

14.4 ORGANIC CHEMISTRY - Medicines  
CONTROLLED TERM: R059 MACHINERY - Freeze-drying

ABSTRACT:

NEW MATERIAL: A complex of fibroblast cell growth factor(GOF) and glycosaminoglycan.

USE: A healing promoter of burn, wound and postoperative tissue and remedy for thrombosis and arteriosclerosis by regeneration action of blood-vessel.

PREPARATION: For example, a plasmid containing DNA coding a human basic fibroblast cell growth factor (human bFGF) is digested with a restriction enzyme and bonded with a proper phage vector and then inserted into Escherichia coli bacterium to transform the bacterium and the bacterium is sown on a plate and plaque containing recombinant phage is picked up and a basic sequence of recombinant part is decided by dideoxynucleotide synthesis chain stopping method and a clone having human bFGFDNA is selected. Then the clone is cultured and a human bFGF mutein is collected and brought into contact with glycosaminoglycan (e.g., heparin) in an aqueous medium to provide the aimed complex.

ANSWER 1 OF 1 HCAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS

ACCESSION NUMBER: 1990:546034 HCAPLUS

DOCUMENT NUMBER: 113:146034

TITLE: Manufacture of stabilized fibroblast growth factor mutant-glucosaminoglycan complex or composition  
INVENTOR(S): Kato, Koichi; Kawahara, Kenji; Kajio, Tomoko  
PATENT ASSIGNEE(S): Takeda Chemical Industries, Ltd., Japan  
SOURCE: Jpn. Kokai Tokyo Koho, 14 pp.  
CODEN: JKXXAF

DOCUMENT TYPE: Patent

LANGUAGE: Japanese

FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1

PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 02040399	A2	19900209	JP 1988-187367	19880727 <--

AB The title complex or compn. is manufd. by mixing fibroblast growth factor mutant with glucosaminoglycans (i.e. heparin, heparan sulfate, dermatan sulfate) in an aq. medium. Thus, recombinant fibroblast growth factor mutant in pH 7.4 phosphate buffer was incubated with Na heparin at 37.degree. for 48 h. At 1:1 mol ratio, the compn. (or complex) retained 100% of the growth factor activity vs. 3% for the control. A stable injection contained recombinant fibroblast growth factor mutant 0.5, Na heparin sulfate 0.37, and Na citrate 15 mg.

ANSWER 1 OF 1 DGENE COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

ACCESSION NUMBER: 1990N-Q03580 DNA DGENE

TITLE: Complex of fibroblast growth factor (FGF) mutein - and its stable compsns. with glycosamino glyan in aq. medium

PATENT ASSIGNEE: (TAKE)Takeda Chemical Ind. KK

PATENT INFO: JP 02040399 A 19880209 14p

APPLICATION INFO: JP 1988-187357 19880727

PRIORITY INFO: JP 1988-187367 19880227

PAT. SEQ. LOC: Disclosure; Fig 1

DATA ENTRY DATE: 02 AUG 1989 (first entry)

DOCUMENT TYPE: Patent

LANGUAGE: Japanese

OTHER SOURCE: 1990-087311 [12]

CROSS REFERENCES: P-PSDB: 1990P-R05545

DESCRIPTION: Fibroblast growth factor mutant

KEYWORD: Fibroblast growth factor mutant; glycosaminoglycan; bFGF; ss

ORGANISM: Homo sapiens

ABSTRACT:

Compsn. contg. FGF mutein and glycosaminoglycan in aq. medium produce stable FGF mutein

NUCLEIC ACID COUNTS: 121 A; 105 C; 118 G; 100 T;

SEQUENCE LENGTH: 444

SEQUENCE

```
1 atgccagcat tgcccgagga tggcggcagc ggcgccttcc cgcccggcca
51 cttcaaggac cccaagcggc tgtactgcaa aaacgggggc ttcttcctgc
101 gcatccaccc cgacggccga gttgacgggg tccgggagaa gagcgaccct
151 cacatcaagc tacaacttca agcagaagag agaggagtgt tgtctatcaa
201 aggagtgtgt gctaaccggt acctggctat gaaggaagat ggaagattac
251 tggcttctaa atgtgttacg gatgagtgtt tcttttttga acgattggaa
301 tctaataact acaatactta ccggtcaagg aaatacacca gttggtatgt
351 ggcactgaaa cgaactgggc agtataaact tggatccaaa acaggacctg
401 ggcagaaagc tatacttttt cttccaatgt ctgctaagag ctga
```

⑫ 公開特許公報(A) 平2-40399

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

C 07 K 13/00  
A 61 K 37/02

識別記号

ZNA  
ABW  
ABX  
ACB  
ADA  
ADT

庁内整理番号

8318-4H  
8615-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)2月9日

C 12 N 15/12  
C 12 P 21/02

C

6712-4B  
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全14頁)

⑮ 発明の名称 線維芽細胞増殖因子ムテインの複合体あるいは組成物

⑯ 特 願 昭63-187367

⑰ 出 願 昭63(1988)7月27日

⑱ 発 明 者 加 藤 光 一 兵庫県川辺郡猪名川町伏見台1丁目2番地の49  
⑱ 発 明 者 河 原 賢 治 大阪府和泉市伏屋町428番地の57  
⑱ 発 明 者 鍛 冶 尾 知 子 大阪府箕面市瀬川1丁目7番地の11  
⑲ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号  
⑳ 代 理 人 弁理士 岩 田 弘

明 細 書

1. 発明の名称

線維芽細胞増殖因子ムテインの複合体あるいは組成物

2. 特許請求の範囲

(1)、線維芽細胞増殖因子(FGF)ムテインとグリコサミノグリカンとの複合体あるいはこれらを配合した組成物。

(2)、FGFムテインが、少なくとも1個のヒト塩基性FGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインである請求項1記載の複合体あるいは組成物。

(3)、グリコサミノグリカンがヘパリン、ヘパラン硫酸またはデルマタン硫酸である請求項1記載の複合体あるいは組成物。

(4)、さらに二または三塩基性カルボン酸を配合した請求項1記載の組成物。

(5)、線維芽細胞増殖因子(FGF)ムテインとグリコサミノグリカンとを水性媒体中で接触させることを特徴とするFGFムテインとグリコサミ

ノグリカンとの複合体あるいはこれらを配合した組成物の製造法。

(6)、FGFムテインが、少なくとも1個のヒト塩基性FGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインである請求項5記載の製造法。

(7)、グリコサミノグリカンがヘパリン、ヘパラン硫酸またはデルマタン硫酸である請求項5記載の製造法。

(8)、さらに二または三塩基性カルボン酸を配合した請求項5記載の製造法。

(9)、線維芽細胞増殖因子(FGF)ムテインとグリコサミノグリカンとを水性媒体中で接触させることを特徴とするFGFムテインの安定化方法。

(10)、FGFムテインが、少なくとも1個のヒト塩基性FGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインである請求項9記載の安定化方法。

(11)、グリコサミノグリカンがヘパリン、ヘパラン硫酸またはデルマタン硫酸である請求項9記

法の安定化方法。

(12)、FGFムテインにグリコサミノグリカンおよびニまたは三塩基性カルボン酸を接触させる請求項9記載の安定化方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor,以下FGFと略称する。)ムテインの安定化方法および安定なFGFムテイン含有複合体あるいは組成物およびこれらの製造法に関する。

#### 従来の技術

FGFは、当初HALL/3T3細胞などの線維芽細胞に対して強い増殖促進作用を示す因子として分離された[ブスボグロヴィツ、ネイチャー(Nature):249巻、123頁(1974年)]。現在では、FGFが、中胚葉由来のほとんどすべての細胞に対して増殖促進作用を有することが知られている。FGFは、その等電点に基づいて、塩基性FGF(以下、bFGFと略称する。)およ

び酸性FGF(以下、aFGFと略称する。)の2つに大別される。これらのFGFは、血管内皮細胞に対して強い増殖促進作用やプラスミノゲンアクチベーター誘導作用を有するため、血管新生促進剤、創傷治癒薬、抗血栓薬、抗動脈硬化剤などの予防治療としての用途が期待されている。

従来から、FGFは動物由来のタンパク質、たとえばウシ脳下垂体、から単一にまで精製されていたが、その供給量には限度があり、また異種動物由来であるために抗原性が懸念されるなどの問題点を有していた。最近、組換えDNA技術を用いて、クローン化されたヒトFGF遺伝子を微生物や動物細胞で発現させることにより、FGFを大量に生産する方法が開発された(フェブス・レターズ(FEB S Letters),第213巻、189-194頁(1987年);ヨーロッパ特許出願公開第237,966号公報参照)。

さらに、FGFのアミノ酸配列を修飾することによって、優れた活性を有しあるいは安定性が向上したムテインを生産する方法が開発された[日

本特許出願第63-50249号明細書、ヨーロッパ特許出願第88103047、2号明細書、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical and Biophysical Research Communications)第151巻第701-708頁(1988年)]。

#### 発明が解決しようとする課題

ところが、FGFムテインは安定性が向上されているものの、水溶液中で急速に失活することがあり、凍結乾燥操作によっても容易にその生物活性が低下することがある。さらに、点滴静注など長時間かけてFGFムテインを投与する場合には、その間の力価低下が避けられないこともある。

FGFの失活がヘパリンなどのある種のグリコサミノグリカンの添加によって防止できることが報告されている[ジャーナル・オブ・セルラー・フィジオロジー(J. Cellular Physiology)128巻、475頁(1986年)]。

#### 課題を解決するための手段

上記の事情に鑑み、本発明者らは鋭意研究を遂

ねたところ、意外にもFGFムテインの水溶液にグリコサミノグリカンを添加することにより、FGFムテインの安定性が顕著に増大することを見出し、これに基づいてさらに研究した結果、本発明を完成した。

本発明は、(1)、FGFムテインとグリコサミノグリカンとの複合体あるいはこれらを配合した組成物;(2)、FGFムテインとグリコサミノグリカンとを水性媒体中で接触させることによるFGFムテインとグリコサミノグリカンとの複合体あるいはこれらを配合した組成物の製造法;および(3)、FGFムテインとグリコサミノグリカンとを水性媒体中で接触させることによるFGFムテインの安定化方法である。

上記FGFとしては、塩基性のもの(以下、bFGFと略称することもある。)でもよく、酸性のもの(以下、aFGFと略称することもある。)でもよい。

上記FGFは、哺乳動物由来のものが挙げられる。該哺乳動物としては、ヒト、サル、ブタ、ウシ、

ヒツジ、ウマなどが挙げられる。

該FGFとしては、脳や下垂体などの既にその存在が明らかにされている各種臓器から抽出されるものが挙げられる。

本発明のムテインとしては、上記のFGFのムテインが挙げられる。

本発明で用いられるFGFムテインとしては、たとえば日本特許出願第63-50249号明細書、ヨーロッパ特許出願第88103047、2号明細書、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications) 第151巻第701-708頁 (1988年)に記載のムテインが挙げられる。

たとえば、本発明におけるFGFムテインとしては、本来、元のペプチドあるいは蛋白質のアミノ酸配列が変異したものであり、したがって該変異としては、アミノ酸の付加、構成アミノ酸の欠損、他のアミノ酸への置換が挙げられる。

該アミノ酸の付加としては、少なくとも1個の

アミノ酸が付加しているものが挙げられる。

該構成アミノ酸の欠損としては、少なくとも1個のFGF構成アミノ酸が欠損しているものが挙げられる。

該他のアミノ酸への置換としては、少なくとも1個のFGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているものが挙げられる。

FGFに少なくとも1個のアミノ酸が付加しているムテインにおける少なくとも1個のアミノ酸としては、ペプチドを発現する際に用いられる開始コドンに基因するメチオニンや、シグナルペプチドは含まれないものである。

付加されているアミノ酸の数としては、少なくとも1個であるが、FGFの特徴を失わない限り何個でもよい。さらに好ましくは、FGFと相同性(ホモロジー)が認められており、同様の活性を示すタンパクのアミノ酸配列の一部あるいはすべてが挙げられる。

FGFの少なくとも1個のFGF構成アミノ酸が欠損しているムテインにおける欠損している構

成アミノ酸の数としては、FGFの有する特徴を失わない限り何個でもよい。

該欠損している構成アミノ酸の例としては、

ヒトFGFのアミノ末端例10残基:

Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser.

ヒトFGFのアミノ末端例14残基:

Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro.

ヒトFGFのアミノ末端例41残基:

Met-Pro-Ala-Leu-...-Val

ヒトFGFのカルギキシル末端例61残基:

Lys-Cys-...-Lys-Ser

などが挙げられる。

FGFの少なくとも1個のFGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインにおける置換される前の少なくとも1個のFGF構成アミノ酸の数としては、FGFの特徴を失わない限

り何個でもよい。

置換される前の構成アミノ酸の例としては、システイン、システイン以外のものが挙げられる。システインが特に好ましい。置換される前の構成アミノ酸としてシステイン以外のものとしては、アスパラギン酸、アルギニン、グリシン、バリンなどが挙げられる。

置換される前の構成アミノ酸がシステインである場合には、置換されたアミノ酸としては、たとえば中性アミノ酸が好ましい。該中性アミノ酸の具体例としては、たとえば、グリシン、バリン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、チロニン、フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン、セリン、スレオニン、メチオニンなどが挙げられる。特に、セリン、スレオニンが好ましい。

置換される前の構成アミノ酸がシステイン以外のものである場合には、置換された別のアミノ酸としては、たとえば、アミノ酸の脂溶性、疎水性あるいは電荷の点で、置換される前のアミノ酸とは異なる性質をもつものを選ぶ。具体的には置換

される前のアミノ酸がアスパラギン酸の場合には、置換されたあとのアミノ酸としてアスパラギン、スレオニン、バリン、フェニルアラニン、アルギニンなどが挙げられるが、特にアスパラギン、アルギニンが好ましい。

置換される前のアミノ酸がアルギニンの場合には置換されたあとのアミノ酸としてグルタミン、スレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸が挙げられるが、特にグルタミンが好ましい。

置換される前の構成アミノ酸がグリシンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、スレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、セリン、グルタミン酸、アルギニンなどが挙げられ、特にスレオニンが好ましい。

置換される前の構成アミノ酸がセリンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、メチオニン、アラニン、ロイシン、システイン、グルタミン、アルギニン、アスパラギン酸などが挙げられ、特にメチオニンが好ましい。

置換される前の構成アミノ酸がバリンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、セリン、ロイシン、プロリン、グリシン、リジン、アスパラギン酸などが挙げられ、特にセリンが好ましい。

置換される前の元の構成アミノ酸としては、アスパラギン酸、アルギニン、グリシン、セリン、バリンが好ましい。

置換されたあとのアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、スレオニン、メチオニン、セリン、ロイシンが好ましい。

置換されたムチインの最も好ましいものとしては、構成アミノ酸であるシステインがセリンに置換されたものが最も好ましい。

上記の置換においては、2以上の置換を同時に行なってもよい。特に、2または3例の構成アミノ酸が置換されるのが好ましい。

該ムチインは、上記した付加、欠損、置換の2つまたは3つが組み合わさったものでよい。

該ムチインを製造するためには、特定部位指向

性変異誘発技術(Site-directed mutagenesis)が採用される。該技術は周知であり、アール・エフ・レイザー(Lather, R. F.)及びジェイ・ビー・レコック(Lecock, J. P.)、ジェネティック・エンジニアリング(Genetic Engineering)、アカデミックプレス社(1983年)第31-50頁、に示されている。オリゴヌクレオチドに指示された変異誘発はエム・スミス(Smith, W.)及びエス・ギラム(Gillam, S.)、ジェネティック・エンジニアリング:原理と方法、ブレナムプレス社(1981年)3巻 1-32頁に示されている。

該ムチインをコードする構造遺伝子を製造するためには、たとえば、

(a) DGFの構造遺伝子の1本鎖からなる1本鎖DNAを突然変異誘発オリゴヌクレオチドプライマーと複合形成させる(この1本鎖で代替すべきシステイン用コドン、又は場合によりこのコドンと対合をつくるアンチセンス・トリプレットを包含する領域に対して上記プライマーは相補的なものである。但し、当該コドンの他のアミノ酸暗

号化用コドン、又は場合によりアンチセンス・トリプレットとの不一致はこの限りでない。)、

(b) DNAポリメラーゼによりプライマーを伸長させ、突然変異性ヘテロ二重体(heteroduplex)を形成させる、及び

(c) この突然変異性ヘテロ二重体を複製する。次に、突然変異化された遺伝子を複製するファージDNAを単離し、プラスミドへ組み込む。

このようにして得られたプラスミドで適当な宿主を形質転換し、得られた形質転換体を培地に培養することにより、ムチインを製造することができる。

グリコサミノグリカンは、ムコ多糖類とも呼ばれる多糖の一つであり、二糖類がくりかえし反復して結合した分岐のない多糖類から構成される。二つの糖残基のうち一つが常にアミノ糖(N-アセチル-D-グリコサミンまたはN-アセチル-D-ガラクトサミン)であることが特徴である。グリコサミノグリカンは通常糖残基の多くに硫酸基またはカルボキシル基もしくはその両方を有し

ている。

本発明で用いられるグリコサミノグリカンとしては、上記の特徴を備えたグリコサミノグリカンならばいずれでも良いが、くりかえし二糖鎖の一方がD-グルクロン酸、L-イズロン酸、もしくはD-ガラクトースからなり、もう一方がN-アセチル-D-グリコサミンもしくはN-アセチル-D-ガラクトサミンからなるものが望ましい。これらの糖のはかに複数のD-ガラクトース、D-キシロース、D-マンノース、L-フコース、D-ガラクトサミンなどを含有しても良い。また、二糖単位あたり約0.1~3.0個の硫酸基を有しているものが望ましく、分子量は、約1,000~100,000、好ましくは約2,000~50,000の範囲に含まれる。

該グリコサミノグリカンの具体例としては、たとえばヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸などの各種臓器から抽出、精製されるものが挙げられる。さらに、硫酸化水素等を用いて低分子化した低分子ヘパリン、低分子ヘパラン硫酸などが挙げられる。

該三塩基性カルボン酸としては、たとえばクエン酸、イソクエン酸などが挙げられる。

上記カルボン酸は遊離のものでも良くまた塩の形のものでもよい。該塩としてはたとえばナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。

また、水媒体にカルボン酸の遊離のものを加え、次いで過当量のアルカリまたは酸を加えて所望のpHにしてもよい。アルカリを加えることにより、水媒体中で、カルボン酸は、塩の形となっていてよく、遊離のものと塩の形のものが見在していてもよい。

FGFムテインをグリコサミノグリカンに水媒体中で接触させる際に、グリコサミノグリカンの使用量は、FGFムテイン1モルに対し、グリコサミノグリカンが約0.1~100モル、さらに好ましくは約0.5~4モルの範囲で加えることが好ましい。

水媒体中におけるグリコサミノグリカンの濃度は、約0.0005~5g/V%が好ましく、さ

げられる。

本発明で用いられるグリコサミノグリカンは、遊離のものでも良く、また塩の形のものでも良い。該塩としては、たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、トリメチルアンモニウム塩などが挙げられる。

また、FGFムテインに水媒体中で接触させる際に、グリコサミノグリカンの遊離のものを加え、次に過当量のアルカリまたは酸を加えて所望のpHにしてもよい。アルカリを加えることにより、グリコサミノグリカンは、水媒体中で塩の形となっていてよく、遊離のものと塩の形のものが見在していてもよい。

本発明のFGFムテインをグリコサミノグリカンに水媒体中で接触させる際に、さらに二または三塩基性カルボン酸の存在下に行なうと、FGFムテインがより安定化されるので有利である。

該二塩基性カルボン酸としては、たとえば酒石酸、マレイン酸、リンゴ酸、フマル酸などが挙げられる。

に、約0.01~1g/V%が好ましい。

水媒体中におけるFGFムテインの濃度は、約0.0005~5g/V%が好ましく、さらに約0.01~1g/V%が好ましい。

該カルボン酸の使用量としては、水媒体中の濃度が約1mM~1Mが好ましく、さらに約10mM~500mMが好ましい。

水媒体中で接触させるには、FGFムテイン、グリコサミノグリカン、さらにカルボン酸を水媒体中で単に混合するだけで目的を通し得る。

該水媒体としては、注射用蒸留水を用いるのが好ましい。

混合する際の条件としては、FGFムテイン、グリコサミノグリカン、さらにカルボン酸のそれぞれを水溶液として混合しても良く、また固体のまま添加して水媒体中で溶液と成しても良い。混合の際の温度は約0~40℃、pHは約3~10の範囲にあることが好ましく、さらに約5~10の範囲にあることが好ましい。混合に要する時間は通常約1~30分である。



上記方法により、安定化されたFGFムテインの組成物が得られる。

該安定化されたFGFムテイン組成物中では、FGFムテインとグリコサミノグリカンとは一定の割合で結合し複合体を形成して存在していると考えられる。したがって、所望により安定化されたFGFムテイン複合体を単離することもできる。単離、採取法としては、たとえば、セファデックスやTSKゲルなどを用いるゲルろ過法や、DFAE-またはCM-トヨパールなどを用いるイオン交換クロマトグラフィー、等電点分画法などが挙げられる。従って、目的に応じてFGFムテイン複合体を単離、採取しても良いし、単離、採取せずにそのまま組成物として用いても良い。

該複合体は、FGFムテインとグリコサミノグリカンとが約1:0.5〜約1:5で複合体を形成したものである。なお、該複合体はたとえば1M NaClなどの高濃度の塩類の存在下で解離するので、単離操作中は高いイオン強度を有する溶液の使用を避ける必要がある。

の製剤学的製造法に準じ、所望により製剤学的に許容され得る添加剤、希釈剤、賦形剤などを用いる。

たとえば、注射用水溶液剤とする場合は、水性溶剤(例、蒸留水)、水溶性溶剤(例、生理的食塩水、リンゲル液)、油性溶剤(例、ゴマ油、オリーブ油)等の溶剤、または所望により溶解補助剤(例、ナリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム)、緩衝剤(例、クエン酸ナトリウム、グリセリン)、等温化剤(例、ブドウ糖、転化糖)、安定剤(例、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール)、保存剤(例、ベンジルアルコール、フェノール)、無菌化剤(例、塩化ベンジルコニウム、塩酸プロカイン)等の添加剤を用いて、常法手段により製造される。

また、たとえば固型状注射用製剤とするには、希釈剤(例、蒸留水、生理的食塩水、ブドウ糖)、賦形剤(例、カルボキシメチルセルロース(CMC)、アルギン酸ナトリウム)、保存剤(例、ベンジルアルコール、塩化ベンジルコニウム、フェノール)、無菌化剤(ブドウ糖、グルコン酸カルシウム、塩酸プロカイン)等を混合し、常法手段により、固型状

このようにして、安定化されたFGFムテインの複合体あるいは組成物が得られる。すなわち、後述の実施例により示されるように、本発明の複合体あるいは組成物は、熱、pH、プロテアーゼに対して安定である。

特に、本発明の複合体あるいは組成物は、中性条件下においてはもとより、酸性およびアルカリ性条件下においても安定である。

該安定化されたFGFムテイン複合体もしくは安定化されたFGFムテイン組成物は、そのまま、または他の薬理学的に許容されうる担体、賦形剤、希釈剤とともに医薬組成物(例、注射剤、錠剤、カプセル剤、液剤、軟膏)として、温血動物(例、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、犬、ネコ)に対して経口的または経口的に安全に投与することができる。

該製剤としては、たとえば、注射剤、注射投与に用いるための溶液、凍結品もしくは凍結乾燥品などの形態にするのが好ましい。

医薬組成物としての製剤化にあたっては、公知

注射用製剤に製造することができる。

さらに、製剤化にあたっては、ブドウ糖などの単糖類や、アミノ酸、各種塩類、ヒト血清アルブミンなどを添加しても良く、その他に等温化剤、pH調節剤、無菌化剤、防腐剤などを加えて安定で有効なFGFムテイン製剤を調製することができる。

上記の方法により得られるFGFムテイン複合体もしくは組成物は線維芽細胞の増殖を促進させる作用等を有し、安定性が高く、毒性は低いため、火傷、創傷、術後組織などの治癒促進剤、あるいは血管新生作用による血栓症や動脈硬化症などの治療薬として用いることができる。また、細胞増殖を促進させるための試薬として用いることができる。

本発明の方法により得られたFGFムテイン複合体もしくは組成物を上記した医薬として用いる場合には、たとえば上記した温血動物に、投与ルート、症状などを考慮して、FGFムテインの量として1日1回約1μgないし100μg/kgの中か

ら適当量を選んで投与される。

また、本発明方法により得られたFGFムテイン複合体もしくは組成物を細胞培養を促進させるための試薬として用いる場合、FGFムテインの量として培養1あたり約0.01~10μg、さらに好ましくは約0.1~10μgとなるように培養に加えることが好ましい。

このようにして、FGFムテインにグリコサミノグリカンを水媒体中で接触させることにより、FGFムテインを安定化することができ、また安定化されたFGFムテイン複合体を得ることができるので、FGFムテインを安定な作用を持続させたままで製剤化できる。

後述の参考例1において用いられたプラスミドpTB669を保持する形質転換体エシエリキア・コリ(Escherichia coli)K12 MM294/pTB669(IFO 14532,FERMBP-1281)は、ヨーロッパ特許出願公開第237,966号公報の実施例3に記載の方法で製造されたものである。

後述の実施例において用いられたリコンビナントヒト塩基性FGFムテインCS23(以下、rhbFGFムテインCS23と略称することもある。)は、[特許出願第63-50249号明細書、ヨーロッパ特許出願第88103047,2号明細書、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ第151巻第701~708頁(1988年)に記載の方法で製造される。すなわち、該rhbFGFムテインCS23は、形質転換体エシエリキア・コリMM294/pTB762(IFO 14613,FERMBP-1645)を用いて、後述の参考例1~3(上述の文献等に記載の方法と同様の方法である。)に記載の方法で製造、精製されたものである。

上述の形質転換体E. coli K12 MM294/pTB669(後述の参考例1において用いられたプラスミドpTB669を保持する。)、およびE. coli MM294/pTB762(後述の参考例3参照)は、財団法人発酵研究所(IFO)および

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に寄託されている。それらの受託番号および受託日を次の表1に示す。なお、FRIへの寄託については、当初国内寄託がなされFERMP番号で示される受託番号が付され、該寄託はブダペスト条約に基づく寄託に切換えられて、FERMBP番号で示される受託番号が付され、同研究所(FRI)に保管されている。

(以下空白)

形質転換体	表 1	
	IFO	FRI
E. coli K12 MM294/ pTB669	IFO 14532 (昭和61年8月11日)	FERM P-8916 FERM BP-1281 (昭和61年8月21日)
E. coli MM294/ pTB762	IFO 14613 (昭和62年5月27日)	FERM P-9409 FERM BP-1645 (昭和62年6月11日)

なお、以下の参考例におけるヒトbFGFのアミノ酸配列のアミノ酸の番号は、第1図に示されたヒトbFGFのアミノ酸配列のN末端のMetを第1番目として数えるものとする。

参考例1 (ムテインをコードする塩基配列を有する組換えDNAの製造)

(1)、ヒトbFGF遺伝子のM13ベクターのクローニング:

ヨーロッパ特許出願公開第237,966号公報明細書の実施例3で得られたプラスミドpTB669を制限酵素EcoRI及びBamHIで消化させた。ファージベクターM13ap8 (ジェイ・メッシング(J. Messing), メソッス・イン・エンジモロジー, 101, 20~78 (1983)) 複製型(RF)DNAを制限酵素EcoRI及びBamHIで消化させ、予めEcoRI及びBamHIで消化させてあったpTB669由来のヒトbFGF DNA断片と混合した。次に混合物をT4 DNAリガーゼで連結させ、連結DNAを大腸菌-JM105菌株の感受性能力のある固体中へ形質転換させ、

5' > CGT TCT TGC TGT AGA  
GCC GCT < 3'

(Cys26をSerに変更するためのプライマー(制限酵素RsaIの認識配列が消失する。)) 40ピコモルをT1キナーゼにより37℃で1時間処理した。50 mM NaCl, 1.0 mM トリス-HCl, pH 8.0, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub> 及び 1.0 mM β-メルカプトエタノールを含む混合物 50 μl 中で、このキナーゼ処理されたプライマー(12ピコモル)を67℃で5分、及び42℃で25分加熱することによって1本鎖(ss)M13-PO DNA 5 μgに複製形成させた。アニーリングした混合物を次に水上で冷却し、0.5 mM 各デオキシヌクレオチド三磷酸(dNTP)、80 mM トリス-HCl, pH 7.4, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM NaCl, DNAポリマーゼI (Klenow 断片) 9単位, 0.5 mM ATP 及び T4 DNAリカーゼ2単位を含む反応混合物 50 μl に添加し、37℃で3時間及び25℃で2時間反応し、0.2 mM EDTA 2 μl を加え反応を停止した。感

XbaI を指示種とするプレート上に播き (ジェイ・メッシング等、ニュークレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Res.) (1981) 9巻309-321頁)、組換えファージを含むブランク(白いブランク)を拾い上げ、組み換え部分の塩基配列をジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法(J. Messing 等、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Res.) 9, 309 (1981)) によって決定して、ヒトbFGF DNAが正確に挿入されていることを確認した。

このM13-POクローンから1本鎖ファージDNAを精製し、合成オリゴヌクレオチドを使用する特定部位指向性変異誘発の母型として用いた。

(2) サイト特異的突然変異誘発

0.1 mM アデノシン三磷酸(ATP)、50 mM ヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩(トリス-HCl) pH 8.0, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ジチオスレイトール(DTT) 及び T4 キナーゼ 9 単位の存在下に、50 μl 中で合成オリゴヌクレオチド

感受能力のあるJM105細胞の形質転換に使用し、菌を一夜培養させ、培養基上澄液からssDNAを単離した。このssDNAをプライマー伸長の第2サイクルに母型として使用し、ゲル精製されたRF型DNAを感受能力のあるJM105細胞中へ形質転換させ、寒天プレート上に播き、一夜培養するとファージブランクが得られた。

(3) 特定部位指向性変異誘発:

上の(2)項の操作をくり返すが、但し使用の合成オリゴヌクレオチドプライマーは、システイン70を暗号づけるものからセリンを暗号づけるもので

5' > AAC GAT TAG CGC TC  
A CTC C < 3'

とする。(制限酵素HaeIIの認識配列が生成される)

(4) 特定部位指向性変異誘発:

上の(2)項の操作をくり返すが、但し使用の合成オリゴヌクレオチドプライマーは、システイン88を暗号づけるものからセリンを暗号づけるもので

5' > GTA ACA GAC TTA GA  
A GCT AGT < 3'

とする。(制限酵素A1uIの認識配列が生成される)

(5) 特定部位指向性変異誘発:

上の(2)項の操作をくり返すが、但し使用の合成オリゴヌクレオチドプライマーは、システイン93を暗号づけるものからセリンを暗号づけるもので

5' > TCG AAG AAG AAA GA  
C TCA TCC < 3'

とする。(制限酵素HinfIの認識配列が生成される)

(6) 突然変異誘発処理されたブラークのふるい分けと同定:

突然変異させたM13-POブラークの入ったプレート類(上記(1)項)並びに突然変異しないM13-POファージブラークの入った2枚のプレートを4℃に冷却し、各プレートからのブラークを2枚のニトロセロース円形フィルター上へ、

10×SSCを含む洗浄用緩衝液中でそれぞれ30分、50℃でフィルター類を洗った。フィルター類を、初めに2×SSCを含んだ緩衝液で洗い、突然変異化されないM13-POブラークを含む対照フィルターはガイガー計数管を用いて放射能の存在について検査した。SSC濃度を段階的に低下させ、本突然変異M13-POブラークをもつ対照フィルター上に検出可能な放射能が検出なくなるまでフィルター類を洗った。SSCの使用最低濃度は0.1×SSCであった。フィルターを真空乾燥し、-70℃で2-3日露光してオートラジオグラフをとった。突然変異したM13-POのブラーク10000個と突然変異されない対照ブラーク100個をキナーゼ処理したオリゴヌクレオチドプローブによってふるい分けた。対照ブラークではプローブと塩基形成したものが全く存在せず、一方突然変異されたM13-POブラーク3-10個がプローブと塩基を形成した。

突然変異M13-POブラークの1個を取り上

第一フィルターの場合には乾燥フィルターを硝子プレート上へ5分置ね、第二フィルターの場合は15分置ねて移した。次に0.2N NaOH、1.5M NaCl及び0.2%トリトンX-100に5分浸した硝子のろ紙上へフィルター類を置き、次に0.5Mトリス-HCl, pH7.5、及び1.5M NaClに浸したろ紙上へ更に5分置ねて中和した。フィルター類を同様なやり方で2×SSC(標準クエン酸塩)に浸したフィルター上で2回洗い、乾燥し、真空乾燥炉内で80℃で2時間乾燥させた。重複フィルター類をフィルター当たり10μlのDNA塩基形成緩衝液(5×SSC), pH7.0, 4×デンハート液(ポリビニルピロリドン、フィコール及び牛血清アルブミン, 1×=各0.02%), 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), 50mM磷酸ナトリウム緩衝液, pH7.0及び100μg/μlの、変性サケ精子DNAにより、55℃で4時間、事前塩基形成させた。オリゴヌクレオチドプライマーを10<sup>5</sup>cpm/μlに42℃で24時間塩基形成させた。0.1%SDSと減少

17, JM105培養基へ接種した。上澄液からssDNAをつくり、固体ベレットから2本鎖(ds)DNAをつくった。適当なオリゴヌクレオチドプライマーとssDNAを使用して塩基配列を解析した。

その結果、TGC(Cys26)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys70)コドンがAGC(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys88)コドンが、TCT(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys93)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたことがそれぞれ確認された。

変異したM13-POファージのうち、コドンCys-26がSerになったものをM13-P1、コドンCys-70がSerになったものをM13-P2、コドンCys-88がSerになったものをM13-P3、コドンCys-93がSerになったものをM13-P4とした。

歩行例2 (突然変異誘発処理されたブラークのふるい分けと同定)

参考例1で得られた突然変異させたM13-P2ファージブラックの入ったプレート順並びに参考例1で得られた突然変異しないM13-P2ファージブラックの入った2枚のプレートを4℃に冷却し、各プレートからのブラックを2枚のニトロセルロース円形フィルター上へ、第一フィルターの場合には乾燥フィルターを凍天プレート上へ5分置ね、第二フィルターの場合は15分置ねて移した。次に0.2N NaOH、1.5M NaCl及び0.2%トリトンX-100に5分浸した厚手のろ紙上へフィルター順を置き、次に0.5M トリス-HCl, pH 7.5、及び1.5M NaClに浸したろ紙上へ更に5分置ねて中和した。フィルター順を同様なやり方で2×SSC(標準クエン酸塩)に浸したフィルター上で2回洗い、乾燥し、真空乾燥炉内で80℃で2時間乾燥させた。重複フィルター順をフィルター当たり10μlのDNA増殖形成緩衝液(5×SSC), pH 7.0, 4×デンハード液(ポリビニルピロリドン、フィコール及び牛血清アルブミン, 1×=各0.02%)、

0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), 50 μM硝酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0及び100 μg/mlの、変性サケ精子DNAにより、55℃で4時間、事前増殖形成させた。オリゴヌクレオチドプライマーを10°Cps/mlに42℃で24時間増殖形成させた。0.1%SDSと減少量のSSCを含有する洗浄用緩衝液中でそれぞれ30分、50℃でフィルター順を洗った。フィルター順を、初めに2×SSCを含んだ緩衝液で洗い、突然変異化されないM13-P2ブラックを含有する対照フィルターはガイガー計数管を用いて放射能の存在について検査した。SSC濃度を段階的に低下させ、未突然変異M13-P2ブラックをもつ対照フィルター上に検出可能な放射能が現なくなるまでフィルター順を洗った。SSCの使用最低濃度は0.1×SSCであった。フィルターを真空乾燥し、-70℃で2~3日露光してオートラジオグラフをとった。突然変異したM13-P2のブラック10000個と突然変異されない対照ブラック100個をキナーゼ処理したオリゴヌ

クレオチドプローブによってふるい分けた。対照ブラックではプローブと増殖形成したものが全く存在せず、一方突然変異されたM13-P2ブラック3~10個がプローブと増殖を形成した。

突然変異M13-P2ブラックの1個を取り上げ、JM105培養基へ接種した。上澄液からssDNAをつくり、固体ベレットから2本鎖(ds)DNAをつくった。適当なオリゴヌクレオチドプライマーとssDNAを使用して塩基配列を解析した。

その結果、TGC(Cys26)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys88)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたこと、TGT(Cys93)コドンがTCT(Ser)コドンへ変換されたことがそれぞれ確認された。

変異したM13-P2ファージのうち、コドンCys-26および-70がSerになったものをM13-P12、コドンCys-70および-88がSerになったものをM13-P23、コドンCys-70および-93がSerになったものをM13

-P24とした。

#### 参考例3 (ヒトbFGFのムテインをコードする遺伝子の大断片における発現)

前記参考例2で得られたM13-P23のレブリカティブフォーム(RF)を制限酵素EcoRIおよびPstIで切断し、ヒトbFGFのムテインをコードする領域を含む約0.5Kb DNA断片を得た。

一方、trpプロモーターを有するプラスミドpTrp781(Kurokawa, T. らニュークレイック・アシックス・リサーチ(Nucleic Acids Res.) 11, 3077-3085(1983)) DNAをEcoRI-PstIで切断して、trpプロモーター、テトラサイクリン耐性遺伝子およびプラスミド複製開始部位を含む約3.2Kb DNA断片を分離した。ヒトbFGFのムテインをコードする遺伝子領域を含む前記0.5Kb EcoRI-PstI DNA断片と、この3.2Kb DNA断片をT4DNAリガーゼ反応により結合させヒトbFGFのムテイン発現用プラスミドpTB762

を構築した。

このプラスミド pTB762 を用いて大腸菌 MM294 を形質転換させることによりムテイン C23 をコードする遺伝子を含有するプラスミド pTB762 を含む菌株 *Escherichia coli* MM294/pTB762 (IFO 14613, FERM BP-1645) を得た。

## (2) 菌体抽出液の調製

前記形質転換体を、それぞれ 1% グルコース、0.4% カザミノ酸、8  $\mu$ g/μl テトラサイクリンを含む M9 培地で培養し、Klett 値が約 200 の時点で、3  $\beta$  インドリールアクリル酸を 25  $\mu$ g/μl になるように添加し、さらに 4 時間培養した。培養後、菌体を集め、1/20 量の 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10% シュウクロース溶液に懸濁した。この懸濁液にフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) を 1 mM, EDTA を 10 mM, NaCl を 0.1 M, スペルミジン塩酸塩を 10 mM, リゾチームを 100  $\mu$ g/μl (いずれも最終濃度) となるように添加し、0℃、

45 分放置後、30 秒間超音波処理を加えた。

この溶液を 18000 rpm (サーバル遠心機, SS 34 ローター) 30 分間遠心して上清を得、菌体抽出液とした。

## (3) 菌体抽出液のヒト bFGF 活性

マウス BALB/c 3T3 細胞を 5% 仔牛血清を含む DMEM 培地に厚達し、96 マイクロタイタープレート (平底) に 1 穴あたり 0.2  $\mu$ l ( $2 \times 10^3$  個) ずつ播種して、培養し、翌日、0.5% 仔牛血清を含む DMEM 培地に交換した。3 日間培養したのち 0.5% BSA を含む DMEM 培地で 5 倍ずつ段階的に希釈した菌体抽出液を 1 穴あたり 10  $\mu$ l ずつ添加して、培養し、20 時間後に  $^3$ H-Tdr (5 Ci/μmol, 0.5  $\mu$ Ci/μl RCC Aershaa) を各穴に 2  $\mu$ l ずつ加えた。6 時間後に細胞を 0.2% トリプシン-0.02% EDTA を含むリン酸緩衝液 (PBS) 処理でがし、タイターテックセルハーベスターを用いて、ガラスフィルター上に細胞を捕集し細胞に取り込まれた  $^3$ H-Tdr 量をシンチレーションカウンタ

にて測定した。

その結果、*E. coli* MM294/pTB762 の菌体抽出液は、FGF 活性を示した。

このようにして、ヒト bFGF の 70 位および 88 位の Cys がそれぞれ Ser に置換された rbbFGF ムテイン CS23 が得られた。

(4) 上記(3)で得られた抽出液 25  $\mu$ l (培養液 500  $\mu$ l より調製) を 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 M NaCl 溶液で平衡化した DEAE セルロース (DE52, ワットマン社, 英国) カラム (径  $2 \times 10$  cm) に通し、抽出液中の核酸成分を除去した。カラムからの素通り液および 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 M NaCl 溶液でのカラム洗液を合わせて集めた (DEAE 素通り液 60  $\mu$ l)。

この画分をヘパリンカラム Shodex AF-pak HR-894 (8 mm ID  $\times$  5 cm, 昭和電工製) を装備した高速液体クロマトグラフィー装置 (ギルソン社, フランス) にかけて。カラムを、20 mM Tris-HCl, pH 7.4 溶液、次いで 20 mM

Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl 溶液で洗った後、20 mM Tris-HCl, pH 7.4, バッファー中、0.5 M から 2 M の NaCl の直線勾配溶出 (linear gradient elution, 60  $\mu$ l, 流速 1.0  $\mu$ l/min) を行った。

溶出時間 15 ~ 25 分の間に溶出されたピーク画分が rbbFGF ムテイン CS23 を含むことが分かったので、この画分を採取した。宝酒造株式会社製の牛乳由来 FGF (純度 95% 以上) の FGF 活性を基準とする比活性は、1.1 ag-protein FGF/ag protein であった。

## 参考文献 (内皮細胞を用いるヒト bFGF の活性測定法)

後述の実験例における FGF 活性の測定は、次に示す方法によって行なった。

10% 仔牛血清を含む DMEM 培地で 2 倍ずつ段階的に希釈した試料を 96 マイクロタイタープレート (平底) に 1 穴あたり 50  $\mu$ l 添加したのち、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) から購入した牛胎児心臓内皮

細胞(CRL 1395)を1穴あたり50μl(2×10<sup>3</sup>個)ずつ播種し、3日間培養した。その後、MTT溶液(5mg/μl PBS, シグマ社)を各穴に20μlずつ加えた。4.5時間後10%SDS-0.01N HClを100μl加えて培養器内で放置したのち、タイターテックマルチスキャンを用いて590nmにおける吸光度を測定した[多田ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー・メソッズ(Journal of Immunological Methods):93巻、157頁(1986年)]。

#### 実施例1

20mMリン酸緩衝液(pH7.4)に、参考例3で得られたrhbFGFムテインCS23を200μg/μlになるように加えたものに、ヘパリンナトリウム(分子量6,000~25,000)もしくは低分子量ヘパリンナトリウム(分子量3,900~6,400)を添加して37℃で48時間インキュベートした。ヘパリンナトリウムの終濃度を200μg/μl(モル比1:1)および2mg/μl(モル比1:10)に、低分子量ヘパリンナトリウムの

濃ナトリウム(分子量11,000~25,000)のグリコサミノグリカン類を終濃度500μg/μlまたは25μg/μlになるように添加して37℃で48時間インキュベートした。対照群として無添加群を置いた。18時間後の残存活性を表3に示す。対照群では、FGF活性はほとんど失われたにもかかわらず、グリコサミノグリカン類添加群ではFGF活性が安定に保持されていた。

表 3

添 加 物	濃 度 (μg/μl)	残存FGF 活性(%)
ヘパリンナトリウム	500	100
ヘパリンナトリウム	25	100
ヘパリン硫酸ナトリウム	500	100
ヘパリン硫酸ナトリウム	25	98
デルマタン硫酸ナトリウム	500	95
無 添 加	-	0

#### 実施例3

50mMのクエン酸ナトリウム(pH7.4)溶液に、参考例3で得られたrhbFGFムテインCS23を100μg/μlになるように加えたものに、

終濃度67μg/μl(モル比1:1)に設定した。対照群として無添加群を置いた。48時間後の残存活性を表2に示す。対照群では、FGF活性はほとんど失われたにもかかわらず、ヘパリンナトリウムおよび低分子量ヘパリンナトリウム添加群ではFGF活性が安定に保持されていた。

表 2

添 加 物	モル比	残存FGF 活性(%)
ヘパリンナトリウム	1:1	100
ヘパリンナトリウム	1:10	100
低分子量ヘパリンナトリウム	1:1	100
無 添 加		3

#### 実施例2

ウシ胎児血清を10%含有するグルベッコMEM培地に、参考例3で得られたrhbFGFムテインCS23を10μg/μlになるように加えたものに、ヘパリンナトリウム(分子量6,000~25,000)、ヘパリン硫酸ナトリウム(分子量10,000~15,000)またはデルマタン硫酸

ナトリウム(平均分子量12,000)を終濃度73μg/μl(モル比1:1)になるように添加して56℃で4時間インキュベートした。対照としてヘパリンナトリウム無添加群を置いた。30分および4時間後の残存活性を表4に示す。表4に示された結果から明らかなように、対照群ではFGF活性は低下したにもかかわらず、ヘパリンナトリウム添加群では、高温下においてもFGF活性の低下が防がれている。

表 4

添 加 物	インキュベーション時間	残存FGF 活性(%)
ヘパリンナトリウム	30分	93
ヘパリンナトリウム	4時間	97
ヘパリンナトリウム	16時間	71
無 添 加	30分	53
無 添 加	4時間	1
無 添 加	16時間	0

#### 実施例4

2mMのリン酸緩衝液(pH7.0)に参考例3で得られたrhbFGFムテインCS23を100μg

／ $\mu\text{g}$ になるように加えたものに、ヘパリンナトリウム(平均分子量12,000)を最終濃度73  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  (モル比1:1)になるように添加して37℃でpH3.0, 5.0, 7.4および9.7の条件下に2時間インキュベートした。表5に2時間後の残存FGF活性を示す。

表5に示した結果から明らかなように、いずれのpHにおいても対照群ではFGF活性は著しく低下したにもかかわらず、ヘパリンナトリウム添加群ではFGF活性が高く保持されていた。

表 5

添 加 物	pH	残存FGF活性(%)
ヘパリンナトリウム	3.0	70
ヘパリンナトリウム	5.0	100
ヘパリンナトリウム	7.4	98
ヘパリンナトリウム	9.7	85
無 添 加	3.0	30
無 添 加	5.0	45
無 添 加	7.4	60
無 添 加	9.7	28

参考例3で得られたrhbFGFムテインCS 23(980  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )1容と平均分子量4,900の低分子量ヘパリンナトリウム(3  $\text{mg}/\mu\text{g}$ )1容とを混合した。混合液の750  $\mu\text{g}$ をTSK-ゲル3000SW(東ソー社製)カラム(0.75×60 cm)に吸附し、0.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を含む0.1M リン酸緩衝液(pH6.0)を用いて溶出した。溶出速度は1.0  $\mu\text{g}/\text{min}$ 。検出波長は230 nm。混合液は単一のピーク(ピーク1)を与えた(第2図)。ピーク1を分取して分析した結果、rhbFGFムテインCS 23と低分子量ヘパリンナトリウムとをモル比1:2の割合で含有する両者の複合体であった。rhbFGFムテインCS 23および低分子量ヘパリンナトリウムを単独で溶出した場合の溶出位置を第2図中にそれぞれ●および○で示した。複合体はrhbFGFムテインCS 23および低分子量ヘパリンナトリウムよりも高分子量側に溶出された。その分子量は第2図より約70,000と推定された。

## 実施例5

参考例3で得られたrhbFGFムテインCS 23を100  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ に、平均分子量12,000のヘパリンナトリウムを73  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  (モル比1:1)になるように8 mMのHClに添加した後、ペプシンを4  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ になるように加えた(最終pH2.1)。ヘパリンナトリウム無添加群を対照とした。反応液を37℃で30分間インキュベートし、残存FGF活性を測定した(表6)。対照群ではFGF活性はほとんど失われたにもかかわらず、ヘパリンナトリウム添加群ではFGF活性が安定に保持されていたことから、ペプシン消化に対してrhbFGFムテインCS 23が安定化されたことが分かる。

表 6

添 加 物	残存FGF活性(%)
ヘパリンナトリウム	100
無 添 加	0

## 実施例6

## 実施例7

参考例3で得られたrhbFGFムテインCS 23, 0.5  $\text{mg}$ 、ヘパリン硫酸ナトリウム, 0.37  $\text{mg}$ 、クエン酸ナトリウム1.5  $\text{mg}$ を含む溶液(pH7.4)を調製して、安定な注射液を得た。

## 発明の効果

FGFムテインにグリコサミノグリカンを水性媒体中で接触させることにより、FGFムテインを安定化させることができるので、FGFムテインを安定な作用を持続せしめよう製剤化することができる。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、ヒトbFGFをコードする塩基配列と、それから推測されるアミノ酸配列とを示す。

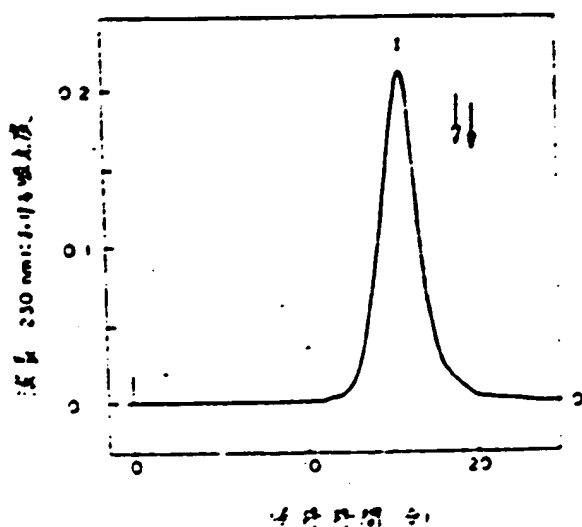
第2図は、実施例6で得られた、rhbFGFムテインCS 23と低分子量ヘパリンとの組成物のゲルろ過パターンを示す。



第 1 圖

MetProAlaLeuPr	GluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTGCCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC		60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg		40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA		120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu		60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAGAG		180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp		80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT		240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu		100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTCCTTTTGAACGATTGGAA		300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys		120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA		300
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe		140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT		420
LeuProMetSerAlaLysSertrn		147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA		444

第 2 圖



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**